

University of Groningen

Coagulation factor VIIa: prohemostatic drug and biomarker for thrombosis

Schut, Anne Marieke

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Schut, A. M. (2016). *Coagulation factor VIIa: prohemostatic drug and biomarker for thrombosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

8

Nederlandse Samenvatting

Dankwoord

List of Publications

List of Abbreviations

About the Author

Nederlandse Samenvatting

Recombinant factor VIIa (rFVIIa, NovoSeven) is geregistreerd voor de behandeling van bloedingen of als chirurgische profylaxe in patiënten met hemofilie die door remmende antistoffen niet meer met suppletie van factor VIII of IX behandeld kunnen worden. Recente klinische studies laten zien dat rFVIIa ook effectief is als profylaxe voor niet-chirurgische bloedingen. Een eendaagse toediening van rFVIIa vermindert het aantal bloedingen in deze patiënten, wat suggereert dat rFVIIa een pro-hemostatisch effect heeft van 24 uur. Dit is lastig te verklaren, omdat de halfwaardetijd van rFVIIa ongeveer 2 uur is en daarmee veel korter dan de duur van het klinische effect.

Het werkingsmechanisme van profylactisch toegediend rFVIIa is tot op heden nog niet volledig bekend. Eerder onderzoek resulteerde in twee hypothesen voor het werkingsmechanisme van rFVIIa in een profylactische setting.

Ten eerste heeft *in vitro* onderzoek laten zien dat rFVIIa opgenomen wordt door bloedplaatjes, waarin rFVIIa hemostatisch actief blijft. rFVIIa in bloedplaatjes zou beschermd kunnen zijn tegen klaringen, en een (veel) langere halfwaardetijd dan rFVIIa in plasma kunnen hebben. Wij hebben in een *in vivo* onderzoek gekeken naar de concentratie en klaring van rFVIIa in plasma en bloedplaatjes. De resultaten van deze studie zijn in **hoofdstuk 2** beschreven. In dit onderzoek hebben varkens een eenmalige dosis rFVIIa toegediend gekregen, en zijn ze tot 48 uur na deze toediening gevolgd waarbij op gezette tijden bloed is afgenomen. Tot 48 uur na toediening van rFVIIa hebben we verhoogde levels van functioneel actief rFVIIa gemeten in bloedplaatjes en bloedplasma ten opzichte van baseline levels. Ook leek de halfwaarde tijd van rFVIIa in bloedplaatjes langer dan de halfwaardetijd in plasma. In deze studie hebben we niet alleen bevestigd dat rFVIIa ook *in vivo* wordt opgenomen door bloedplaatjes, maar laten we ook zien dat rFVIIa opgenomen door bloedplaatjes functioneel actief blijft. De lage concentraties rFVIIa in bloedplaatjes en plasma uren na toediening zouden het pro-hemostatische effect van rFVIIa in een profylactische setting kunnen verklaren. We stellen voor dat voor de preventie van bloedingen veel lagere concentraties rFVIIa nodig zijn dan voor het behandelen van actieve bloedingen.

Ten tweede kan het profylactische effect van rFVIIa verklaard worden door de relocatie van rFVIIa vanuit de bloedbaan naar diverse weefsels zoals spieren, gewrichten en beenmerg. Het rFVIIa wat opgenomen is door weefsels blijft hemostatisch actief, en dit zou mogelijk lokaal de stollingsactiviteit kunnen verhogen waardoor bloedingen voorkomen

kunnen worden. Studies in muizen suggereren dat rFVIIa opgenomen wordt door megakaryocyten in het beenmerg. Megakaryocyten zijn de voorlopercellen van bloedplaatjes, en wij hypothetiseerden dat deze megakaryocyten rFVIIa bevattende bloedplaatjes kunnen produceren. Onze bevindingen beschrijven we in **hoofdstuk 3**. We laten zien dat megakaryocyten *in vitro* rFVIIa opnemen en na stimulatie bloedplaatjes produceren die hemostatisch actief rFVIIa bevatten. Het proces van opname tot productie van bloedplaatjes duurt 3 dagen, en we stellen voor dat dit proces van rFVIIa relocatie naar megakaryocyten, gevolgd door productie van rFVIIa bevattende bloedplaatjes naast directe opname van rFVIIa door bloedplaatjes zelf, het langdurige profylactische effect van rFVIIa verklaart.

Het eiwit glycoproteïne Ib α (GPIb) op het oppervlak van bloedplaatjes heeft een belangrijke rol in het hechten van bloedplaatjes aan een beschadigde vaatwand. Daarnaast is GPIb een belangrijke receptor voor de binding van diverse stollingsfactoren, waaronder FVIIa. Binding van stollingseiwitten aan GPIb moduleren stollingsreacties zoals we al eerder hebben laten zien voor binding van rFVIIa aan GPIb. In **hoofdstuk 4** beschrijven we ons onderzoek naar de binding van factor IX aan GPIb en daarin de betekenis van de aan- of afwezigheid van deze receptor in de FIX gemedieerde bloedstolling. Deze studie is een onderdeel van een lopend onderzoek in ons laboratorium waarin we geïnteresseerd zijn in de interactie van stollingsfactoren met GPIb.

Naast recombinant FVIIa als pro-hemostatisch medicijn, hebben we ook onderzoek gedaan naar factor VIIa als biomarker voor veneuze trombose. Er is nog weinig bekend over hoe een veneuze trombus ontstaat. In tegenstelling tot arteriële trombose, is bij veneuze trombose de vaatwand intact, en lijkt de stollingsactivatie te ontstaan door componenten aanwezig in het bloed. Uit onderzoek blijkt dat tissue factor-dragende micropartikels hierin een belangrijke rol spelen. Tissue factor-gemedieerde stollingsactivatie (extrinsieke stolling) begint met de omzetting van factor VII naar factor VIIa, en het lijkt daarom aannemelijk dat verhoogde plasmaspiegels van FVIIa actieve trombusvorming reflecteren.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we onze resultaten over het ontstaan van stollingsactivatie na een vliegreis. Eerdere studies hebben stollingsactivatie laten zien in gezonde proefpersonen na een vliegreis, maar het is nog onduidelijk via welk mechanisme het stollingssysteem geactiveerd wordt. Uit onze studie waarin we plasma spiegels van FVII en FVIIa hebben gemeten in dezelfde gezonde proefpersonen, kunnen we concluderen dat deze stollingsactivatie niet via de extrinsieke route plaatsvindt.

In **hoofdstuk 6** hebben we FVIIa plasma spiegels gemeten in patiënten met diep veneuze trombose en controles. Tot onze verbazing vonden we verlaagde FVIIa levels in patiënten met diep veneuze trombose, wat wellicht verklaard zou kunnen worden doordat er wel actieve FVII naar FVIIa omzetting in deze patiënten plaatsvindt, maar dat het gevormde FVIIa snel geïnactiveerd wordt. We concluderen dat de extrinsieke route mogelijk een rol speelt in het ontstaan van diep veneuze trombose.

Dankwoord

In 2011 reisde ik vanuit Oxford, mijn toenmalige woonplaats en werkomgeving, naar Groningen voor mijn sollicitatie bij het UMCG. Mijn grote wens was terug te keren naar Nederland en hier te promoveren. Deze kans heb ik gekregen en met beide handen aangegrepen. En hier is het dan, vijf jaar hard werken heeft uiteindelijk geresulteerd in dit boekje! Promoveren doe je niet alleen en daarom wil ik een aantal mensen bedanken.

Ten eerste wil ik mijn promotor Prof. Dr. J.A. Lisman bedanken. Beste Ton, jij hebt me vanaf het begin begeleid. Ik heb het onderzoek over recombinant factor VIIa, waar jij in Utrecht op bent gepromoveerd, kunnen voortzetten in je eigen onderzoeksgroep in Groningen. Van jou heb ik de fijne kneepjes geleerd van wetenschappelijk onderzoek doen en me dankzij jouw kritische blik kunnen ontwikkelen in wetenschappelijk schrijven. We hebben leerzame discussies gehad over wetenschappelijke integriteit en de ontwikkelingen binnen de wetenschap. Ik ben heel trots dat we 4 van de 5 artikelen gepubliceerd hebben gekregen en dat ik mijn promotie onder jouw supervisie heb kunnen afronden. Daarnaast wil ik mijn tweede promotor Prof. Dr. Ph.G. de Groot bedanken. Beste Flip, door jouw kritische meedenken en ideeën heb ik mijn promotie mede onder jouw supervisie succesvol kunnen afronden.

Tevens wil ik de overige co-auteurs van mijn artikelen bedanken voor de samenwerking en de succesvolle publicaties die we hebben kunnen neerzetten; Frits R. Rosendaal, Joost C.M. Meijers, Saskia Middeldorp, Suzanne C. Cannegieter, Michiel Coppens, Mark Roest, Rolf T. Urbanus, Yvonne Lisman-van Leeuwen, Annemarie Venemans-Jellema, Maurits L. van Montfoort, Jelle Adelmeijer, Marc Kirschbaum en Agon Hyseni.

Graag wil ik ook de leescommissieleden, Prof. Dr. K. Meijer, Prof. Dr. R.J. Porte en Prof. Dr. H. ten Cate, bedanken voor jullie tijd om mijn proefschrift te lezen en te beoordelen.

Daarnaast wil ik al mijn collega's op het chirurgisch onderzoekslaboratorium in Groningen bedanken. Jelle, je hebt gouden handen die werkelijk alles kunnen pipeteren. Susanne en Renee, bedankt voor al jullie werk rondom de proefdieren. Marc, we zijn tegelijkertijd begonnen aan onze PhD en hebben zelfs een gezamenlijke publicatie weten neer te zetten. Golnar en Valerie, jullie waren fijne kamergenootjes. Jacco, jij regelde alles op het lab en ik kon altijd bij je terecht met vragen. Janneke, bedankt voor je hulp bij de histochemie. Greg, bedankt voor alle leuke gesprekken en je inspiratie voor de meest uiteenlopende ideeën voor weer een nieuw project. Douwe, dank voor alle hulp en support als zijnde de expert van de celkweek en facs. Roos, we hebben een geweldig labuitje neergezet. Jurjen,

dank dat je mij op basis van je brede kennis van labtechnieken hebt geadviseerd en hebt meegedacht. Sanna en Negin, jullie hebben een prachtig project met orgaanperfusie weten te realiseren en ik herinner de momenten om 7 uur 's ochtends bij de slager nog goed. Michael, je woonde handig dichtbij het UMCG voor een gezellige borrel met collega's. Daarnaast wil ik graag alle anderen voor de tijd in het lab of in de aio kamers bedanken; Petra, Welmoet, Marjolein, Maxi, Wilma, Peter, Leon, Marco, Dafna, Yuan, Edris, Dane, Andrie, Geert, Laura, Rolando en Paria. Verder wil ik ook graag Rianne bedanken, een zeer betrokken studente die ik tijdens mijn promotie heb mogen begeleiden.

Voor een aantal studies heb ik het werk in het laboratorium klinische chemie en hematologie gedaan in het UMC Utrecht. Tesy, heel erg bedankt voor al je hulp bij de ELISA metingen en onze ritjes terug op één fiets na een lange dag pipeteren. Joukje, je hebt altijd klaargestaan om te helpen. En ik wil graag alle anderen van het lab bedanken. Naast de dagen op het lab, kwamen we elkaar ook daarbuiten tegen op de jaarlijks terugkerende NVTH-dagen en PhD-dagen; Vivian, Maarten, Marije, Claudia, Agon, Thijs, Coen, Arnold, Eelo en Bert. Marco, we waren goed in een puntje aan de horizon uitkiezen wat eindigde in een eindeloze strandwandeling en een biertje op 't eindpunt, voor we dat enorme eind terug moesten. Steven, ik wens je veel succes met je promotie die toevallig een dag na die van mij zal plaatsvinden. Nic, je altijd opgewekte humeur was aanstekelijk. Marisa, het was erg leuk je te leren kennen op het ISTH-congres.

Groningen heeft mij een muzikale uitdaging geboden; doedelzak leren spelen. Ik wil iedereen van de Clan MacBeth Pipe band bedanken voor deze geweldige muzikale tijd en ik mis de gezelligheid van de band.

Ik wil al mijn collega's bij het IKNL bedanken voor hun interesse en support tijdens het schrijven van mijn proefschrift en ook mijn huidige collega's bij Novartis.

Ik heb nooit kunnen promoveren zonder de steun van mijn vrienden en familie.

Chantal, we hebben beide in Wageningen gestudeerd, maar leerden elkaar pas kennen in Groningen. Wat is de wereld dan toch klein! Onze vriendschap is in die jaren gegroeid en we konden altijd lief en leed met elkaar delen. Daarnaast gingen we altijd op pad en hebben we zo veel mogelijk restaurantjes in Groningen uitgeprobeerd. Op 20 oktober 2014 mocht ik paranimf zijn tijdens jouw promotie en ik ben heel blij dat jij dit nu bent tijdens mijn promotie.

Djoke, je was mijn labmaatje. We zaten nog wel eens samen te pipeteren in de celkweek. Het was heel bijzonder om op jouw bruiloftsfeest erbij te zijn geweest. Ik ben blij dat jij paranimf bent tijdens mijn promotie; op naar jouw promotie!

Fari en Renee, jullie hebben me als echte vriendinnen altijd gesteund en in me geloofd.

Joke en Jalb, jullie hebben altijd in me geloofd en me door dik en dun gesteund. Ik wil daarom heel graag mijn proefschrift aan jullie opdragen. Jalb, we hebben menig keer wetenschappelijke discussies gevoerd en dat vond ik altijd erg fijn en waardevol. Ondanks je carrièreswitch blijf je toch altijd onze bioloog en heb ik van jou toch wel de genen meegekregen om verder te gaan in de wetenschap. Ik ben heel trots dat ik in jouw voetsporen heb kunnen treden, met een succesvolle promotie als resultaat. Joke, de inhoud van onze wetenschappelijke discussies gingen jou vaak boven de pet, maar desalniettemin was jouw blik erop altijd heel verhelderend. Aan de start van mijn promotie ben ik van Oxford naar Groningen verhuisd. Het was altijd nog een heel eind, maar er lag in ieder geval geen water meer tussen. Groningen was toch wel onze stad. Ver weg wonen had dan toch het voordeel dat jullie meteen een heel weekend gezellig overkwamen. We hielden onze favoriete plekjes. Joke, ik ben super trots op jou hoe jij je er het afgelopen jaar doorheen hebt geknokt en dat je er nu bij bent om dit samen groots te kunnen vieren.

Hanneke en Daan, jullie waren er altijd voor mij. Hanneke, ik ben je nog steeds heel erg dankbaar voor het meedenken en de goede adviezen. Die hebben me erdoorheen gesleept in de tijden dat ik wel wat hulp kon gebruiken.

Sander, lieverd, wij hebben elkaar leren kennen in mijn laatste jaar in Groningen. Al snel brak de periode aan dat ik mijn proefschrift moest gaan schrijven. Jij bent diegene die hier het dichtste bij stond en ik ben je heel erg dankbaar voor al je geduld, steun, motivatie, hulp en liefde. Je hebt altijd in mij geloofd. Dat waren best pittige jaren, maar het is gelukt! Inmiddels ben je zelf expert in het wereldje van promoveren geworden. We hebben samen de lay-out en cover gemaakt van dit boekje en ik ben supertrots op ons dat we dit werk hebben kunnen neerzetten. Een kers op de taart! Sander, we hebben hoogtepunten zoals geaccepteerde publicaties gevierd en frustraties meegemaakt, maar nu is het af. Nooit meer in de avonden en weekenden eraan te hoeven denken, een heerlijk vooruitzicht!

List of Publications

International peer-reviewed publications

1. Schut AM, Kirschbaum M, Adelmeijer J, de Groot PG, Lisman T. Uptake of recombinant factor VIIa by megakaryocytes with subsequent production of platelet-like particles containing functional active drug. Br J Haematol 2016; [accepted for publication].
2. Schut AM, Meijers JC, Lisman-van Leeuwen Y, van Montfoort ML, Roest M, de Groot PG, Urbanus RT, Coppens M, Lisman T. Decreased plasma levels of activated factor VII in patients with deep vein thrombosis. J Thromb Haemost 2015; 13: 1320-4.
3. Schut AM, Venemans-Jellema A, Meijers JC, Middeldorp S, de Groot PG, Rosendaal FR, Roest M, Lisman T, Cannegieter SC. Coagulation activation during air travel is not initiated via the extrinsic pathway. Br J Haematol 2015; 169: 903-5.
4. Schut AM, Hyseni A, Adelmeijer J, Meijers JC, de Groot PG, Lisman T. Sustained pro-haemostatic activity of rFVIIa in non-bleeding pigs may explain efficacy of once-daily prophylaxis in humans. Thromb Haemost 2014; 112: 304-10.
5. Eekels JJ, Pasternak AO, Schut AM, Geerts D, Jeeninga RE, Berkhout B. A competitive cell growth assay for the detection of subtle effects of gene transduction on cell proliferation. Gene Ther 2012; 19: 1058-64.

Dutch publication

6. Schut AM, Lisman T. Het eiwit glycoproteïne Ib α als doelwit voor antistolling. Tromnibus, uitgave van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten 2012; 1: 5-8.

List of Abbreviations

ACD	acid citrate dextrose	FVII	coagulation factor VII
ADP	adenosine diphosphate	FVII:Ag	factor VII antigen
AnnV	Annexin A5	FVII:C	factor VII coagulant activity
APC	activated protein C	FVIIa	activated coagulation factor VII
APCC	activated prothrombin complex concentrate	FVIIa:Ag	activated factor VII antigen
ApoER2	apolipoprotein E receptor 2	FVIIa:C	activated factor VII coagulant activity
APTT	activated partial thromboplastin time	FVIII	coagulation factor VIII
AT	antithrombin	FVIIIa	activated coagulation factor VIII
BU	Bethesda Units	FIX	coagulation factor IX
bsa	bovine serum albumin	FIXa	activated coagulation factor IX
Ca	calcium	FX	coagulation factor X
CHO	Chinese Hamster Ovary	FXa	activated coagulation factor X
CI	confidence interval	FXI	coagulation factor XI
COX	cyclooxygenase	FXIa	activated coagulation factor XI
CVX	convulxin	FXII	coagulation factor XII
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	FXIIa	activated coagulation factor XII
DNA	deoxyribonucleic acid	FXIII	coagulation factor XIII
DVT	deep vein thrombosis	FXIIIa	activated coagulation factor XIII
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	GC	glycocalicin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	Gla	gamma-carboxyglutamic acid-rich
EPCR	endothelial protein C receptor	GP	glycoprotein
FACS	fluorescence activated cell sorting	GPIb-IX-V	GPIb-IX-V complex
FBS	fetal bovine serum	HGF	hepatocyte growth factor
FEIBA	factor eight inhibitor bypassing agent	HMWK	high molecular weight kininogen
FII	coagulation factor II or prothrombin	HRP	horseradish peroxidase
FIIa	activated coagulation factor II or thrombin	IGF	insulin-like growth factor
FV	coagulation factor V	IQR	interquartile range
FVa	activated coagulation factor V	K	kallikrein
		Kd	dissociation constant
		LMWH	low molecular weight heparin
		MEG-01	megakaryoblastic cell line
		mRNA	messenger RNA
		NPP	normal pooled plasma

NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug	rTPO	recombinant human thrombopoietin
OR	odds ratio	SD	standard deviation
OSE	O-sialoglycoprotein endopeptidase	SEM	standard error of mean
PAI-1	plasminogen activator inhibitor type 1	TAFI	thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
PBS	phosphate buffered saline	TAT	thrombin-antithrombin
PC	protein C	TBS	tris-buffered saline
PCC	prothrombin complex concentrate	TEP	tumor-educated platelets
PDGF	platelet-derived growth factor	TF	tissue factor
PGI-2	prostacyclin	TFPI	tissue factor pathway inhibitor
PK	prekallikrein	TM	thrombomodulin
PLP	platelet-like particle	t-PA	tissue plasminogen activator
PPP	platelet-poor plasma	TRAP	thrombin receptor agonist peptide
PRP	platelet-rich plasma	TTP	thrombotic thrombocytopenic purpura
PS	protein S	VEGF	vascular endothelial growth factor
P-sel	P-selectin	VKA	vitamin K antagonist
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1	VWF	von Willebrand factor
PT	prothrombin time	WHO	World Health Organization
PZ	protein Z	WRIGHT	WHO Research Into Global Hazards of Travel
rFVIIa	recombinant activated factor VII	wt	wild type
RNA	ribonucleic acid		
rsTF	recombinant soluble tissue factor		

About the author

Anne Marieke Schut was born in Bemmelen, the Netherlands, on the 19th of November 1986. She went to secondary school at the Nijmeegse Scholengemeenschap Groenewoud (NSG) in Nijmegen, the Netherlands, which she finished in 2005. In the same year she started her BSc study biotechnology at the Wageningen University, the Netherlands, and received her BSc title three years later. She continued with her MSc



biotechnology with the medical specialization, and obtained her MSc degree in 2010. During her MSc she did a research internship at the Academic Medical Center in Amsterdam, the Netherlands. Subsequently she moved to Oxford, United Kingdom, where she started a research internship and continued working at Oxford BioMedica. From Oxford she applied for a PhD position in Groningen, the Netherlands, at the surgical research laboratory at the UMCG. She moved to Groningen and started her 3-year research on (recombinant) factor VIIa in 2011, which resulted in this thesis. During the last two years of writing this thesis, Anne Marieke worked first as data manager and secondly as monitor at the Netherlands Comprehensive Cancer Organisation (IKNL) involved in hematology and oncology studies. Currently, Anne Marieke works as medical information and clinical operation specialist at Novartis in Arnhem, the Netherlands.